

Bírálat Dr. Zupkó István „Természetes vegyületek és szintetikus szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata” című MTA doktori pályázatáról.

Köszönöm, hogy felkértek Dr. Zupkó István MTA Doktori értekezésének bírálatára.

A dolgozat összesen 127 oldal, összességében arányos felépítésű. A Rövidítések jegyzékét a 9 oldalas Bevezetés, majd a „Célkitűzések” fejezet követi. A „Módszerek” fejezet 10 oldal, ezt az Eredmények ismertetése követi 51 oldalon keresztül, majd az eredmények megbeszélése 20 oldalban. Az értekezés legfőbb megállapításait foglalja össze a 7. fejezet, majd bőséges Irodalomjegyzék következik, s végül a Publikációs adatok.

A pályázó 147 *in extenso* munkáját közlő folyóiratok összesített impakt faktora a beadáskor 305,8 volt, a művek idézettsége az MTM szerint 2059 (ebből független 1535). Ezek közül a dolgozat 15 terminális szerzős közleményre épül, az ezeket közlő folyóiratok összesített impakt faktora 37, 7 (átlagosan 2,51, tartomány 0,45-4,01).

A bevezetés áttekintést ad a daganatos megbetegedések epidemiológiájáról és a választott gyógyszerjelölt-típusok (szteránvázas és növényi eredetű vegyületek) eddigi alkalmazásáról. Hasznos lett volna néhány szemléltető ábra, valamint a 3. és 4. alfejezet végén röviden utalni arra, hogy a felvázolt háttértől milyen irányba indul tovább a kutatás (annak ellenére is, hogy ez pár mondatnyi redundanciát okozott volna a célkitűzések ismertetésekor).

A bevezetésben felvetett némely gondolattal nem könnyű azonosulni. Így elsőként zavaró az alapmotiváció, amely a globális antiproliferatív terápiák fejlesztésében, ehhez újabb vezérmolekulák megtalálásában jelöli meg a hatékony daganatterápia jövőjét. A célzott, molekuláris terápiák immár évtizednél hosszabb sikertörténete a specifikus hatású kezelésekre kell terelje a figyelmet, ennek megfelelően az antiproliferatív szerek esetén is azt célszerű vizsgálni, hogy mely célponton hatnak, hogyan lehet a hatásukat specifikusabbá tenni. Mindezek mellett természetesen a gyors sejtosztódás általános gátlószerei várhatóan még sokáig részét képezik a terápiás protolloknak, így ezek spektrumának szélesítése is fontos kutatási terület.

A növényi eredetű biofarmakonok eddig felderítetlen spektrumának szélességére tett becslés a vonatkozó vélemények közül az optimista oldalt képviseli, ugyanis nem veszi figyelembe annak a statisztikus esélyét, hogy a még nem vizsgált növényekben talált farmakonok egy része már felderítésre került más, korábban vizsgált növények esetében, jóllehet saját tapasztalatai is ezt mutatják.

Általános és munkamódszert érintő megjegyzések:

A vegyületek hatásának leírása, még akkor is, ha ez szerkezet-hatás összefüggés-vizsgálat keretében történik, és feltárja, hogy a proliferáció-gátlásban apoptotikus, nekrotikus, és/vagy sejtciklus-szabályozással kapcsolatos folyamatok vesznek részt, deskriptívnek minősíthető. A vizsgált vegyületek támadáspontjáról, hatásmechanizmusáról nem sokat tudunk meg. A mechanisztikus vizsgálatok a sejtciklus változásait, az apoptózis-nekrózis arányát, kaszpáz aktivitás és, néhány sejtciklus-fehérje mRNS, ritkán (foszfo)protein szintű mérését célozzák, a legtöbb esetben a HeLa sejtvonalra szorítkozva.

Többnyire néhány adenocarcinoma sejtvonalra gyakorolt antiproliferatív hatással kerül szembeállításra az MRC-5 fibroblasztokra gyakorolt csekély hatás, és ennek mentén minősítenek vegyületeket „tumorszelektívnek”. Ez a következtetés nem feltétlenül helytálló, hiszen a foetális eredetű fibroblasztokon végzett kísérletek nem helyettesítik a primer epitheliális sejtekkel nyerhető tapasztalatokat. Éppen ezért a hTERT-HME1 sejtek alkalmazása, ha csak egy esetben is történt, üdvözlendő. Ugyanezt tágabb kontextusban értékelve úgy vélem, a tumorszelektivitás *in vivo* tesztelése nélkül az új vezérmolekulák orvosi biológiai jelentősége nehezen ítélni lehet meg.

A kísérletes megközelítés mindezen vonásai a közleményeket befogadó folyóiratok spektrumában is tükröződnek.

A kivitelezésre, prezentációra, interpretációra vonatkozó megjegyzések:

A rövidítésjegyzékben:

a „FBS foetális borjúszerummal” helyesen „FBS foetális borjúsérum” lenne.

a „SEM standard hiba” pontatlan megfogalmazás, ez a mintaközép közepes hibája

a „VEGF vaszkuláris endoteliális...” „...endoteliális...” lenne

Többször használja az „intakt” jelzőt a nem-dagantos szinonimájaként, ez azonban helytelen, hiszen a daganatos sejt is lehet ép, sértetlen.

A 10. oldalon használt „intrakrin” kifejezés helyett az „intracelluláris” az elterjedt elnevezés.

A 11. oldalon, majd később is használja az „élő kórokozó” kifejezést, amely meglehetősen általános. Feltételezem, hogy az „élő” jelző használatának célja a prionok és vírusok kizárása a palettából, ennek ellenére érdemes lett volna pontosítani a megfogalmazást.

A 11. oldaltól többször is egyszerűen „rezisztens”-ként jelöli a multidrog rezisztens sejteket, amely helyenként félreérthető.

A 12. oldalon alkaloidok „növényi sejtekre gyakorolt szuppresszor” hatásáról ír, de vajon milyen folyamatot szuprimálnak? Ugyanitt az „alkaloid a GTP-ázra hatva károsítja tumorsejt citoszkeletonját”, de melyik GTP-ázra?

A 15. oldalon „alkaloidai” helyett az „alkaloidjai”, vagy „alakoidái” lenne helyes. Ugyanitt a „célunk volt a transzporter általi rezisztenciára gyakorolt” pontatlan, „...ABC transzporter...” lenne helyes.

A 4.1 fejezetben az 1% antibiotikum-antimikotikum keverék és 1% L-glutamin helytelen, legfeljebb a megjelölt anyagok törzsoldatát adhatták 1:100 hígításban a médiumhoz. A végkoncentrációt így a dolgozathból nem lehet megtudni.

A 4.2.1. fejezet több pontatlanságot, ill. potenciális hibaforrást tartalmaz.

Az MTT teszt, különösképpen az itt alkalmazott végpontos változatában, nem használható a sejtproliferáció egyértelmű mérésére önállóan, a sejtszám változásának követése nélkül, hiszen mindössze a vizsgált térfogatban adott időben jelenlévő össz mitokondriális aktivitást méri. Ez lehet magas gyakori sejtosztódás nélkül is, ill. alacsony értékek előfordulhatnak akkor is, ha korábban már nagyszámú sejt volt a vizsgált térfogatban, melyek azonban a tápanyag elfogyasztása után pusztulásnak indultak. Ezt a potenciális értelmezési nehézséget a szerző a későbbiekben dicséretes módon felveti, és néhány esetben abszolút sejtszám meghatározást is végez az MTT teszt validálására.

Helytelen a „sejtek reduktázai precipitálták a MTT-ből képződő formazánt” kifejezés, mivel a reduktázok csak létrehozzák a formazánt, az a reduktázok nélkül, önmagában is csapadékot képez.

Kérdéses továbbá, hogy miért éppen 4 órás, MTT jelenlétében történő inkubációt választottak a méréshez, anélkül, hogy az egyes sejtvonalakra külön-külön optimalizálták volna az inkubációs időt, és validálták volna, hogy a sejtre jellemző mitokondriális aktivitás nem fogyasztja-e el az MTT szubsztrátot az inkubációs idő alatt, ezzel meghiúsítva a teszt linearitását, vagy nem termel-e a linárisan mérhető OD-t meghaladó abszorpciót okozó formazán mennyiséget.

Mivel a sejtek passzálása heti két alkalommal történt, ez elég nagy hígításokat feltételez; ilyen körülmények között 30 passzázsig vinni a sejtvonalakat számos buktatót rejt magában, hiszen valójában nem annyira passzálások száma, mint inkább az osztódások száma a fontosabb tényező a genetikai és epigenetikai drift folyamatában.

A 4.2.2 fejezetben a frakcionális inhibíciós indexhez talán illett volna egy alapvető citátumot beilleszteni, pl. Yu és mtsai., J Infect Dis. 1980;142:602-7.

A 4.3 fejezetben a „5000 sejt kitelepítése” meglehetősen furcsa kifejezés. Ugyanitt a „fluoreszcens mikroszkópia” helyett a „fluoreszcenciás” használatát javasolnám (hiszen a mikroszkópia nem fluoreszkál). A látóterenkénti 150 sejt számolása, noha a magas elemszám miatt jónak tűnik, csak olyan kis nagyítás mellett valószínűsíthető meg, amely a másik célkitűzést, a nukleáris morfológia korrekt megítélését nem teszi lehetővé.

A 4.4. fejezetben „Verity Softwer House” helyett „Verity Software House” lenne helyes.

A 4.7. fejezetben leírt PCR vizsgálatok tervezésében a GAPDH önmagában nem elegendes kontroll, részben mert legalább két, független háztartási gént kell választani és azokat egymásra is normálva validálni, részben mert a potenciálisan citotoxikus ágensek esetén nem szerencsés a sejtmetsabolizmusban résztvevő transzkript használata. Az itt kapott adatokból származtatott 10-30%-nyi mRNS szint csökkenés, mely a legtöbb mérésben bemutatásra került (pl. 16., 23. ábrák), jóllehet kellő esetszám mellett matematikailag szignifikáns különbséget jelent, szabályozási szinten önmagában csekély biológiai jelentőségű, mely jelentőséget tovább csökkenti, hogy a kiolvasás szemikvantitatív módon történt.

A 4.14 fejezetben leírt módszer nem önmagában a ribonukleotid reduktáz aktivitását méri, hanem az RNR aktivitásának, a DNS polimeráz processzivitásának és az S fázisban lévő sejtek arányának a közös eredményét (illetve ezek egymástól való részleges függetlensége esetén a konvolúcióját), melyre a proliferáción kívül a DNS károsodás és javítás folyamata is hatással van.

A statisztikai értékelés leírása meglehetősen szűkszavú, és ebben a formában bizonyosan helytelen, hiszen az ábrákon a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérések kerültek jelölésre, s ennek alapját bizonyára valamilyen, a dolgozatban meg nem nevezett post hoc teszt képezte.

A bemutatott Hoechst-PI festés eredmények, bár vizuálisan is értékelhetőek, minden esetben igényelnék a kvantitálást (szerencsére volt, ahol ez megtörtént). A normál fibroblaszt kontroll bemutatása hiányzik a 3., 12., 41., 45., és 48. ábrán.

A 2. ábra 1. paneljén „4i” felirat szerepel „1i” helyett.

Az „Indikátor a kontroll képen” helyett a „méretvonal” szabatosabb kifejezés lenne.

A 2f, 2g vegyületek hatásmechanizmusának feltárására CDK1, ciklin B és CDC25 mRNS expressziós szinteket vizsgáltak (6. ábra), ami a ciklin B esetén releváns, de a CDK1 és a

CDC25B esetében egy kölcsönös, ciklikus pozitív foszforilációs/defoszforilációs szabályozás tétélezhető fel, így ezt mindenképpen érdemes lett volna explorálni.

A 16. ábrán bemutatott kb. 20%-os p16 ciklininhibitor mRNS szint növekedés kismértékűnek tűnik ahhoz, hogy önmagában megmagyarázza a BrdU inkorporáció és 24 órás mérésben az S fázisú sejtek arányának bemutatott mértékű csökkenését. Természetesen ez a diszkusszióban is proponált mechanizmus egy lehetőség, de kísérletes alátámasztásához szükség lenne annak bemutatására, hogy a p16 géncsökkentését követően elmarad, vagy jelentősen csökken a 6a és 6b vegyületek antiproliferatív hatása.

A 41. oldalon szerepel a „fázisátmenetet facilitáló retinoblasztóma protein” kifejezés, amely nem túl szakszerű, és a fehérje alapvetően tumorsuppresszor jellegű funkciója miatt is félreérthető.

Kérdéses, hogy a Rb mRNS csökkenése hogyan függ össze az S fázisba lépés gátlásával és a BrdU inkorporáció csökkenésével, hiszen ennek tankönyvi adatok alapján éppen az ellenkezőjét várnánk. Ennek feloldására a pályázó a következőt írja: „Azt találtuk, hogy a mindkét kiválasztott vegyület jóval nagyobb mértékben csökkentette a foszforilált, mint a nem foszforilált forma kifejeződését. Ebből azt állapíthatjuk meg, hogy a kezelés jelentős mértékben gátolta az Rb funkcióját, ami összefügg a sejtciklus G1>S fázisátmenetének blokádjával (Sunley és Butler, 2010).” Ezzel az állítással ilyen formában nehéz egyetérteni, hiszen éppen a foszforilálatlan forma funkciója az, hogy akadályozza a sejtciklus progresszióját, és a kezelés ezt a funkciót fokozta, G1/S blokkot hozott létre. Emellett a bemutatott bloton (17. ábra) nem a foszforilálatlan, hanem a teljes Rb látható, és mivel a kísérletből nem derül ki, hogy a pRb hányad része a teljes Rb állománynak, nem állapítható meg a proliferációt gátló szabad Rb mennyiségének változása. A blotok kvantitálásból (amit kíváncsiságból elvégeztem, de a dolgozatban is célszerű lett volna elvégezni) annyi kiderül, hogy a prezentált kísérletben a 10 uM-os dózis a teljes Rb állományt kb. a felére, míg a pRb mennyiségét ötödére csökkentette. Mivel azonban a teljes és a foszforilált Rb mennyisége nem korreláltatható, és így a szabad Rb mennyisége (és annak kezelés hatására bekövetkezett változása) sem becsülhető, így az adatokból a szerző által levont következtetés sem vonható le, legfeljebb a kimeneti hatás alapján feltételezhető. Emellett az is felvetődik, hogy a kontrollban látható kiemelkedő Rb foszforiláció lehet véletlen hiba is – jó példa arra, hogy miért lett volna érdemes több független WB mérést végezni, kvantitálni, és normalizálást követően átlagolni is.

A 18. ábrához tartozó táblázatban az R1 megjelölés helytelen, az ábrán és a molekulában csak egy R csoport van.

A 21. és 22. ábrák megbeszélésének gondolatmenetét ellentmondásosnak érzem: mind a paclitaxel, mind a 2ME M-fázisbeli akkumulációt okoz, de közülük a taxol serkenti, a 2ME pedig gátolja a tubulin polimerizációt. Ennek alapján a D-homoösztroon H3 hiszton-foszforilációt gátló

hatása nem következhet annak MT polimerizációra gyakorolt hatásából. A MT-ra gyakorolt hatás egyébként a görbék és V_{max} értékek alapján tendenciózusan gátló - az, hogy a hatást jelentéktelennek ítélték, azért történhetett, mert a szignifikancia számítása két párhuzamos mérésből értelmetlen (22. ábra, $n=2!$), a próba ereje nem megfelelő. Az adatok alapján a kezelés több hatást is kivált: részben a statmin foszforiláció csökkenésén keresztül, részben közvetlenül gátolja a tubulin polimerizációt és így potenciálisan a G2-M átmenetet, ami már egyébként is gátolt a pH3S10 csökkenéséből ítélve. Figyelembe véve az apoptotikus végkimenetet, ebben a kísérletben is fontos lett volna a p21-p53 tengelyt megvizsgálni. A DNS károsodás ugyanis a p53 útvonalon szabályozza a statmint, így közös forrása lehet a G2 blokknak és az apoptózisnak. (apró inkonzisztencia: A 24. ábrán „statmin” és „stathmin” egyaránt szerepel.)

A lelet preklinikai értékét csökkenti, hogy a hatás szelektíven HeLa sejteken figyelhető meg.

Az 52. oldalon a „potenciált” múlt idejű igeiként történő használata zavaró, talán a „potenciózott” lenne jobb választás.

A 28B. ábra értelmezését segítette volna, ha azon a kombinációs kezelések mellett a releváns önálló kezelések (szolanidin származékok és doxorubicin) hatása is fel lett volna tüntetve.

Ellentmondásnak látszik, hogy a 8c azonos dózisa a 24. órára emelte az S és a G2/M sejtek arányát (30. ábra), bár a ^3H -citidin beépülés csökkent (32. ábra). Ez valószínűleg azzal oldható fel, hogy a ciklusbeli arányok relatív mutatók az összes mért sejthez képest, míg a ^3H -citidin beépülést 5 millió életben maradt sejtől mérték, ignorálva az elpusztultakat.

Itt szeretném újra felidézni azt is, hogy a ^3H -citidin beépülés nem kizárólag a ribonukleotid reduktáz enzimaktivitás függvénye. Emiatt, bár a ribonukleotid reduktáz enzimnek a 8c vegyület, mint antioxidáns, általi gátlása részben magyarázhatja az antiproliferatív hatást, e faktor valódi súlyát a hatásmechanizmusban további kísérletek nélkül nehéz megbecsülni. Fontos lett volna tehát BrdU, vagy triciált dNTP inkorporációt mérni, amely nem függ az RNR aktivitásától, és ily módon elkülöníteni a 8c vegyület RNR gátlását, ill. a többi potenciális célponton keresztül kifejtett hatását.

A 60. oldalon, majd azt követően több ízben szó esik „ABCB1 bénító” tulajdonságról, hatásról. Tekintve, hogy valamennyi esetben szubsztrát kompetícióról van szó, és semmiképp sem kovalens kötődésről vagy allosztérikus hatásról, a bénítás nem csak szóhasználatilag, de jelentését tekintve sem helyes, a gátlás lenne a megfelelő magyar szó.

A 60. oldal utolsó bekezdésében, bár a szöveghez elég közel helyezkedik el a következő oldalon, helyes lenne a 8. táblázatra utalni.

A 39. ábrán bemutatott apoptózis méréseknek az extrém magas 11a és 11d dózisok mellett nincs sok értelme, ugyanakkor a limfóma sejtek szaporodását igen hatékonyan gátló 11c vegyület proapoptotikus hatását nem vizsgálták. A vegyületek és dózisaik egyes kísérletekre történő kiválasztása ezek miatt átgondolatlanak tűnik.

A 63. oldal első bekezdésében a hTERT-HME1 12a-ra vonatkozó IC₅₀ értékét (5,9 μ M) a referenciaként alkalmazott ciszplatin 2,0 μ M-os értékével veti össze, holott a két vegyületnek várhatóan nem azonos a hatásmechanizmusa. Egyébként is, a releváns összehasonlítást tumorszelektivitás szempontjából a malignus és nem malignus epiteliális sejtvonalak között kellene végezni.

A 63. oldalon így fogalmaz: „Az alkaloidok összességében a HeLa sejtvonalra gyakorolták a legmarkánsabb hatást, amiben kiemelkedik a 12g.” Mivel a 12g vegyületet nem vizsgálták az MDA vonalakon és a T47D-n, kiemelkedősége nem lehet bizonyos. Az MDA-MB-231-re a 12a jobban hatott, mint a HeLa-ra, tehát elképzelhető, hogy a 12g is hatékonyabb az MDA-MB-231 gátlásában.

A 41. ábráról nem lehet a szövegben leírt, apoptózisra utaló morfológiai jeleket leolvasni, és az ott alkalmazott kezelési dózisok a citometriás mérésben nem okozzák jelentős szub-G1 frakció megjelenését.

A 42A és 42B ábrák értelmezése kapcsán azt írja, hogy a „kezelés ... emelte az S fázis volumenét”. A diszkusszióban egy hasonló vegyülettel kapcsolatos irodalmi adatok alapján a G1-S átmenet zavarát és a DNS szintézis gátlását jelöli meg lehetséges okként, azonban ennek ellentmond az S fázis felszaporodása. A G1-S-G2/M arányok eltolódása inkább az S fázisban történő megrekedésre utalnak, ami megengedett G1-S átmenetre, és S-fázis ellenőrzési pont aktiválódására utal, melyet okozhat pl. lezáratlan replikációs villa, replikálatlan DNS, vagy a nukleoszómális összeszerelődés elmaradása.

A 66. oldal második bekezdésében leírt 13%-os és 14%-os ABCB1 mRNS szint csökkenés biológiailag jelentéktelennek tűnik. Mivel egy ilyen szintű változás semmiképp nem magyarázza a 12d és 12e vegyületek alacsony FIX és szintén alacsony FA értékei közötti ellentmondást, a szinergia feltárását célzó kísérleteket az ABCB1-et nélkülöző L5178 anyasejtvonalon is el kellett volna végezni.

A 67. oldal alján az „Elvégeztük 13a és 13b fluoreszcens kettős festését 72 órás expozíció után.” mondat nem azt jelenti, amit a szerző vélhetőleg közölni kívánt.

A 49. ábrán, ill. annak ábraszövegében nincs feltüntetve, hogy a fehér oszlopok jelölik a kontrollt. Ugyanez az ábra a 48 órás kezelések esetén bemutatja a G1, S, és G2/M fázisok arányával együtt a szub-G1 sejtek arányát is. Ezeket az arányokat összeadva azonban nem 100%-ot kapunk, hanem jelentősen többet!

Az 50. ábra szövegében a „vegyületek hatása a kaszpázok-3 és -9 aktivitására” nem magyaros.

Összességében több olyan ábrát mutat be a dolgozat, ahol néhány (5-25) százalékos változást a szerző matematikai alapon szignifikánsnak minősít, belőle mechanisztikus következtetést von le, azonban az eredmény valódi biológiai jelentőségét további (leszabályozást, specifikus gátlást vagy aktiválást, megfelelő kontroll sejt vonalat, stb. alkalmazó) kísérletekkel nem támasztja alá, ill. alternatív, vagy párhuzamos folyamatok lehetőségét nem tárja fel.

A Diskusszió fejezet sok tekintetben ismétli az eredmények során már leírtakat, ugyanakkor az olyan komplex folyamatokat, mint a sejtciklus, vagy az apoptózis, bizonyos fokú egyszerűsítésekkel kezeli. Tekintve, hogy a disszertáció jellegénél fogva retrospektív mű, hiányolom a diskusszióból a korábbi közlemények visszhangjának, valamint a vezérmolekulaként bemutatott vegyületek utóéletének, továbbfejlesztésének ismertetését.

A 83. oldalon leírt okfejtés, mely a p53 stabilizálását jelöli meg a 7a vegyület hatásmechanizmusaként tárgyi tévedést és logikai hibát tartalmaz. Abból, hogy két teljesen különböző hatásmechanizmusú készítmény (transzkripciót gátló aktinomicin D és nukleáris exportot gátló leptomicin B) hatására két különböző sejtben a p53 eltérő módon stabilizálódik, nem következik az, hogy az egyik sejtben ugyanez a p53 egy harmadik féle vegyület célpontja. Azt pedig, hogy a roszkovitin szelektíven HeLa sejteken fejtené ki tumorellenes hatását, már az eredeti közlemények sem támasztják alá, és az erre példaként idézett közlemény sem szól erről.

A 90. oldalon a genistein hatásmechanizmusáról szóló részben „p53-Rb jelátvitel” helyett feltehetőleg a „p53-p21” lenne helyes.

A 92. oldalon az „,,, előbbi vegyület nem befolyásolta a sejt inváziós képességét” mondatrészben helyesen „sejtek”-et kellene írni.

A 98. oldalon az Értekezés főbb eredményei fejezetben 14β-HSD1 szerepel 17β-HSD1 helyett.

A 99. oldalon a „sejt túlélésében involvált szabályozó faktor”-ként aposztrofálja a CDK2 és Rb fehérjéket, azonban ezek egyike sem túlélési faktor.

A disszertáció olvasása kapcsán a következő kérdések merültek fel bennem:

1. A 3-metoxi-ösztadiol antiproliferatív hatásának vizsgálata során az 1f és 1h erősebb gátlást fejtett ki, mint a 2h (5. táblázat), ezeket miért nem tekintették érdemesnek a további vizsgálatra?
2. Ugyanitt (és a 13 α -ösztion sorban is), mivel magyarázható nagyobb dózisoknál az S-fázisban lévő sejtek arányának növekedése, ami ellentmond az antiproliferatív hatásnak, és a csökkent CDC25B expresszióknak is?
3. Ugyanezen vegyületek vizsgálata kapcsán vajon mivel magyarázható a CDK1 mRNS csökkenése? (6. ábra)
4. Van-e arra a tendenciára magyarázat, hogy a 3-metoxi-ösztadiol származékok 17b β -OH, míg a 13 α -ösztion sor tagjai 17 α -OH sztereomér formában gátolták hatékonyabban a proliferációt?
5. A 14. ábra kapcsán ezt írja: '...a gátlás mértéke meghaladta az azonos koncentrációban (10 μ M) alkalmazott ciszplatin hatását. Ebből arra következtethetünk, hogy 6a és 6b direkt módon gátolja a DNS szintézisét.' Miként következik a direkt hatás vétele a ciszplatinénál erősebb hatásból?
6. Miért a ciszplatin képezte a referencia standardot, annak ellenére, hogy annak ismert hatásmechanizmusa feltehetőleg nem áll kapcsolatban a tesztelt vegyületek hatásmechanizmusával? (Ez vonatkozik a ciszplatin standardként történő felhasználására a dolgozat további részeiben is.)
7. Mivel magyarázható, hogy a szolanidin származékok közül némelyik (8k) dózisának megtízszerezése akár 74-szeresére növelte, míg másoké (8f) akár 30-adára csökkentette a rodamin akkumulációt jellemző FA (fluoreszcencia arány) értéket (27. táblázat)?
8. Ugyanitt a HL-60-ra kifejtett hatások vizsgálatához miért éppen a 8c, 9a, 9g vegyületeket választották, annak ellenére, hogy a 9a és 9g vegyületek citosztatikus hatása a kitapadó sejtekre elhanyagolható volt, és általában a 3-acetilézés egyébként is rontotta a hatást?
9. A 30. ábra tanúsága szerint a 8c 6 mikromoláris koncentrációban 24 órás kezelés során emelte az S és a G2/M sejtek arányát, viszont az apoptotikus sejtek aránya ekkorra a kontroll szintjével volt azonos, míg a 8. órában még meghaladta a kontroll ötszörösét. Ismert-e adat a sejtciklus 8. órás értékeiről? Lehetséges-e a megfigyeléseket egy közös hatásmóddal magyarázni, vagy két

eltérő hatással állunk szemben, amely eltérő szubpopulációkban okoz, eltérő időfüggéssel, G2/M blokkot és apoptózist?

10. A 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata kapcsán azt írja, hogy a „szteroidmentesített médiumban tendenciaszerűen magasabb IC értékeket kaptunk, ám az eltérés nem nagyságrendnyi, így feltételezzük, hogy az antiproliferatív hatás létrejöttében az ösztrogének metabolizmusára gyakorolt hatás nem játszik szerepet”. Nem nyilvánvaló számomra, hogy ha a vegyületek eredeti célja a HSD gátlása, miért ítéli ezt a hatást, ami a teljes hatás mérhető része, semmisnek. Miért elvárás a nagyságrendnyi különbség a steroid-mentes és steroid tartalmú médiumban kifejtett hatások között? A kísérlet értékelése annyiból is bonyolult, hogy nem világos, a steroid megvonásnak önmagában milyen hatása volt a proliferációra, hiszen a bemutatott adatokból úgy tűnik, csak a steroid megvonást követő relatív inhibitor hatást mérték, a megvonás és az inhibitorok közös, kontrollhoz viszonyított hatását nem.

11. Ugyanitt mi lehet az oka, hogy a legtöbb vegyületre sem az MCF-7 sem az A2780, sem az MRC-5 sejtek nem voltak érzékenyek, csak a HeLa? Lehetséges-e, hogy az érzéketlen sejtvonalakban elsődleges szerepe nem az androsztendion – öszttron útvonalnak, hanem a HSD17B1 enzimet nem igénylő, tesztoszteronon keresztül előállított ösztradiolnak van? Mennyire specifikusak ezek az inhibitorok a többi HSD17 izoenzimre?

12. A további, HeLa sejteken végzett sejtciklus vizsgálatok kapcsán felmerül a kérdés, hogy ha a 10b és 10c vegyületek gátolták a BrdU inkorporációt, hogyan fokozták egyszersmind az S fázisban lévő sejtek arányát a 48 órás mérésben. A 34. és 35. ábrán bemutatott kísérleteket lehet-e koherensen értelmezni, és belőlük egységes narratívát összeállítani arról, hogy a nyilvánvaló, és a 10e és 10f esetén kaszpáz aktiválás mérésével alátámasztott apoptózist az inhibitorok hogyan váltják ki, vagy, hogy a párhuzamosan megjelenő G1/S és G2/M blokk hogyan értelmezhető, és oka lehet-e valamelyik az apoptózis kialakulásának? Miért választotta az apoptózis vizsgálatához a 10e és 10f, míg a géneszpresszió vizsgálatához a 10a, 10b és 10f anyagokat, így egy vegyületre szűkítve az átfogóbb kép alkotásának lehetőségét?

13. Ugyanitt miért az Rb és a CDK2 mRNS szintű expresszióját vizsgálták, és nem az aktiváltsági állapotukat (nem-foszforilált Rb, ciklin E koncentráció, E2F magi transzlokáció)?

14. Tekintve, hogy a 11c vegyület az egér limfóma sejten ABC transzporter hiányában igen hatékony volt, és a HL-60 humán leukémia sejteket is több más kísérletben sikerrel használták célpontként, felmerült-e a továbbiakban a 11c hematopoetikus malignitások iránti szelektivitásának és specifikus hatásmechanizmusának bővebb vizsgálata a HL-60, esetleg további hasonló sejtvonalak bevonásával?

15. Lehet-e tudni, hogy a doxorubicinnel kombinált 11a, de főleg 11c kezelés esetén a szinergizmust inkább az ABC transzporter-működés gátlása, vagy a közvetlen (a doxorubicintól eltérő útvonalon ható) antiproliferatív hatás okozza?

16. A 12a IC₅₀ értéke MCF7 és MDA-MB-231 esetén 4,5 és 2,3 μ M, viszont számottevő apoptózis és valamelyes (nem túl nagy, bár matematikailag szignifikáns) kaspáz-9 aktiválás csak 30 μ M-nál látható. Ennek fényében tekinthető-e a proliferáció-gátlás lényeges elemének az apoptózis aktiválása?

17. Mi lehet az oka, hogy az MDA-MB-231 sejtekben nem jön létre membrán permeabilizálás 12a kezelés hatására, de az MCF7 sejtekben létrejön (41. ábra)?

18. A Rutaceae növényfajokból izolált alkaloidok hatásvizsgálata szépen kivitelezett, és kerek történetet ad. Sajnálatos, hogy csak HeLa sejteken volt kimutatható jelentős hatás, ugyanakkor biztató, hogy MRC-5 sejtekre nem volt befolyással a 13a és 13b vegyület. Volt-e lehetőségük azóta más sejteken is tesztelni ezeket a vegyületeket?

19. A szeszkviterpének vizsgálata során megfigyelhető egy G1/S blokk, de a ciklin E szintjét mégsem vizsgálták. Ugyanakkor mintegy 25%-kal csökkent ciklin B2 szintet mértek, amely csökkenés akkor értelmezhető egyértelműen megnövekedett G2/M frakció okaként, ha megkülönböztetjük a G2 és az M fázisban lévő sejteket. Történt-e ezirányú kísérlet, tekintve, hogy az alfejezet konklúziójaként a vegyületeket további vizsgálatokra érdemesnek tartották?

Az értekezésben prezentált kísérletes munka alábbi megállapításait javaslom új eredményként elfogadni:

Leírta egyes D-gyűrűben szubsztituált triazolt tartalmazó ösztadiol származékok adherens humán tumor-sejtvonalakra gyakorolt proapoptotikus tulajdonságát, melyet a sejtciklus G2/M fázisban bekövetkező blokádja kísér.

Kimutatta ösztro-16-oxim származékok DNS szintézist gátló és pro-apoptotikus hatását HeLa sejteken, ill. antimetabolikus hatását több más tumorsejt esetén.

Feltárta a D-homoösztro-16-oxim HeLa sejtekre kifejtett szelektív, intrinszik úton megvalósuló proapoptotikus hatását, mely G2 blokkal, a H3S10 hipofoszforilációjával és a mikrotubulus polimerizáció gátlásával jár együtt.

Igazolta egyes szolanidin analógok antiproliferatív hatását adherens és leukémia sejtvonalakon, kimutatta, hogy többen az ABCB gátlásával fokozzák a doxorubicin antiproliferatív hatását is. Közülük a 8c kisebb mértékben zavarta a fibroblasztok proliferációját, mint a malignus sejtekét, és gátolta HL-60 sejtekben a jelölt citidin beépülését a DNS állományba.

Kimutatta, hogy egyes, az ösztradiol lokális keletkezésének gátlására tervezett 17 β -HSD1 inhibitorok hormonális hatástól függetlenül gátolják adherens sejtek növekedését, apoptózist váltanak ki HeLa sejteken, és gátolják azokban a BrdU inkorporációt és növelik a p53 és p21 mRNS kifejeződését.

Adherens és limfóma sejtvonalakon jellemezte öt Amaryllidaceae alkaloid antiproliferatív és multidrog rezisztenciát revertáló tulajdonságát. Megállapította, hogy két alkaloid (2-Oacetil-likorin és pretazettin) potenciálja a doxorubicin hatását.

Farmakológiaiilag nem jellemzett akridonvázás alkaloidok közül kiemelkedően hatékonynak találta az izogravakridon-klorint (12a) emlőkarcinóma sejtpanelen és további adherens sejteken, kimutatta, hogy ez a vegyület 10x IC₅₀ dózistól mitokondriális úton apoptózist vált ki MDA-MB-231 sejteken. Kimutatta, hogy ezek az alkaloidok gátolták az ABCB1 transzporter aktivitását, közülük kettő potenciálta a doxorubicin hatását multidrog rezisztens limfóma sejteken.

A Rutaceae növényfajokból származó kinolinvázás alkaloidok közül kettő (kokuszagin és szkimmianin) számottevő tumorszelektív, proapoptotikus hatását mutatta ki HeLa sejteken, mely hatást a DNS szintézis gátlására is sikerült visszavezetnie.

Meghatározta a Kárpát-medencében fellelhető 51 növényfaj 228 kivonatának antiproliferatív hatását adherens sejtvonalakon, s ennek során négy szeszkviterpént azonosított, melyek jelentős apoptózist fokozó, és sejtciklust moduláló hatással bírtak.

A fentiek alapján az értekezés nyilvános vitára bocsátását javaslom.

Debrecen, 2018. február 16.

Dr. Vereb György